

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß sich das beschriebene Kryoglobulin kaum von einem normalen 7 S Immunglobulin unterscheidet. In der Immunelektrophorese bildet es eine bedeutend kürzere Präzipitationslinie, was auf Einheitlichkeit schließen läßt. Sein Molekulargewicht ist etwas höher als das der normalen 7 S Immunglobuline. Diese Differenz dürfte auf kleinen Mengen von Polymeren beruhen, die im Sedimentationsversuch nur zu einer Verschiebung der Werte und nicht zur Ausbildung eines eigenen Gradienten führen.

Der einzige augenscheinliche Unterschied war bei der Untersuchung der antigenwirksamen Stellen der Bruchstücke zu erkennen: während beim normalen γ -Globulin die H-Kette als Antigenträger wirksamer ist, findet man beim Kryoprotein stärkere Wirksamkeit in der II-Kette, die der L-Kette entspricht. Daß die Stärkegelelektrophorese der Bruchstücke des Kryoproteins keine Einheitlichkeit ergibt, mag vielleicht daran liegen, daß die Bruchstücke zur Aggregation neigen.

Dem Österreichischen Forschungsrat, der uns eine analytische Ultrazentrifuge zur Verfügung gestellt hat, sei auf diesem Wege aufrichtiger Dank ausgesprochen.

Literatur

1. LERNER, A. B. und G. R. GREENBERG, J. biol. Chemistry 162, 429 (1946). — 2. ABRAMS, A., P. P. COHEN und O. O. MEYER, J. biol. Chemistry 181, 237 (1949). — 3. BARR, D. P., G. G. READER und C. H. WHEELER, Ann. Int. Med. 32, 6 (1950). — 4. MANDEMA, E. und P. C. SCHAAF, J. Laborat. Clin. Med. S. Louis 45, 261 (1955). — 5. MACKAY, J. R., N. ERIKSEN und N. G. MOTULSKY, Amer. J. Med. XX, 564 (1956). — 6. BONSDORF, B. v., H. GROTH und T. PACKALEN, Folia hämat. 59, 184 (1938). — 7. HOLMBERG, G. und A. GRÖNWALL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 273, 199 (1942). — 8. BLADES, A. N., Brit. Med. J. 4699, 169 (1951). — 9. OLHAGEN, B., Acta med. Scand. 138, 86 (1956). — 10. CAPUTO, A. und E. APPELLA, Arch. Biochem. Biophysics 91, 201 (1960). — 11. GRABER, P. und P. BURTIN, Immunelektrische Analyse, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, New York (1964). — 12. OUCHTERLONY, Ö., Progr. Allergy 5, 1 (1958). — 13. SVEDBERG, T. und K. O. PEDERSEN, The Ultrazentrifuge, Oxford at the Clarendon Press (1940). — 14. FLEISCHMANN, J. B., R. H. PAIN und R. R. PORTER, Arch. Biochem. Biophysics Suppl. 1, 174 (1962). — 15. EDELMAN, G. M. and M. D. POULIK, J. Exper. Med. 113, 861 (1961).

Dr. W. Palm
Universitätsplatz 2
A 8010 Graz

Die gleichzeitige Bestimmung der Sekretionsrate von Cortisol und Corticosteron beim Menschen

Von L. RAITH und H. J. KARL

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. H. Schwiege)

(Eingegangen am 6. November 1967)

Nach dem Isotopenverdünnungsprinzip wurden nach i. v. Injektion von $2 \mu\text{C } ^3\text{H}$ -Cortisol und $0,2 \mu\text{C } ^{14}\text{C}$ -Corticosteron gleichzeitig die Sekretionsraten dieser beiden Steroide beim Menschen bestimmt. Tetrahydrocortisol, ein Metabolit von Cortisol und Tetrahydrocorticosteron, ein Metabolit von Corticosteron wurden aus Urin nach Hydrolyse mit β -Glucuronidase, Extraktion mit Methylenchlorid und Papierchromatographie in den Systemen Bush C, B/50 und LT 21/85 separiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung der Papiereluat wurden Tetrahydrocortisol und Tetrahydrocorticosteron quantitativ mit Tetrazoliumblau-Reagenz bestimmt, die ^3H - und ^{14}C -Impulse dieser Metaboliten gezählt und aus deren spezifischer Aktivität die Sekretionsraten von Cortisol und Corticosteron berechnet. Bei 12 Gesunden betrug die Cortisolsekretion 10,5 mg bis 20,0 mg/Tag und die Corticosteronsekretion 2,3 mg bis 4,2 mg/Tag.

After the i. v. application of $2,0 \mu\text{C } ^3\text{H}$ -cortisol and $0,2 \mu\text{C } ^{14}\text{C}$ -corticosterone the secretion rates of these steroids were measured with aid of the isotope dilution technique. Tetrahydrocortisol, a metabolite of cortisol, and tetrahydrocorticosterone, a metabolite of corticosterone, were separated from urine after hydrolysis with β -glucuronidase, extraction with methylene chloride and paper chromatography in the systems Bush C, B/50 and LT 21/85. The hormones were eluted from the paper and further purified by column chromatography. Tetrahydrocortisol and tetrahydrocorticosterone were then estimated quantitatively with tetrazolium blue reagent and the ^3H - and ^{14}C -impulses of the metabolites were counted. From the specific activity of tetrahydrocortisol and tetrahydrocorticosterone the secretion rates of cortisol and corticosterone were calculated. In 12 normal persons the secretion rate of cortisol was 10,5 mg—20,0 mg/day and the secretion rate of corticosterone 2,3 mg—4,2 mg/day.

Die Sekretionsrate eines Nebennierenrindenhormons kann nach dem Isotopenverdünnungsprinzip bestimmt werden (1, 2). Bei dieser Methode wird nach Applikation eines radioaktiv markierten Corticosteroids die von der Nebennierenrinde in der Zeiteinheit sezernierte bzw. die vom Organismus metabolisierte Hormonmenge aus der spezifischen Aktivität eines aus dem

Urin isolierten Metaboliten dieses Steroids berechnet. Unter den Bedingungen, die von LAUMAS und TART (3, 4) ausführlich diskutiert wurden, ist diese Methode zuverlässig und genau. Sie hat sich bei der Bestimmung der Sekretionsrate von Cortisol (1, 5), von Corticosteron (6, 7) und von Aldosteron (2, 8) bewährt. FLOOD und Mitarbeiter (2) haben erstmals

gleichzeitig die Sekretionsraten von zwei Steroiden, von Cortisol und von Aldosteron, mit ^{14}C oder ^3H markierten Hormonen untersucht.

Wir beschreiben eine Methode, mit der es möglich ist, die Sekretionsrate von Cortisol und von Corticosteron *gleichzeitig* zu bestimmen. Damit werden aus dem von der Nebennierenrinde sezernierten „Hormonspektrum“ zwei Steroide erfaßt, von denen eines, Cortisol, vorwiegend Glucocorticoidwirkung hat, während das andere, Corticosteron, den Kohlenhydratstoffwechsel und den Elektrolythaushalt gleichermaßen beeinflußt.

In dieser Arbeit wird auch auf die besonderen Probleme bei der gleichzeitigen Bestimmung von 2 Sekretionsraten mit verschiedenen radioaktiv markierten Steroiden eingegangen. Außerdem werden Ergebnisse bei Normalpersonen mitgeteilt.

Methodik

Reinsubstanzen und Reagenzien

[1,2- ^3H]-Cortisol = [1,2- ^3H]-11 β ,17 α ,21-trihydroxy- Δ^4 pregnen-3,20-dion; spez. Akt.: 13,0 C/mMol (New England Nuclear Corporation, Bethesda).

[4- ^{14}C]-Corticosteron = [4- ^{14}C]-11 β ,21-dihydroxy- Δ^4 pregnen-3,20-dion; spez. Akt.: 46 mC/mMol (New England Nuclear Corporation, Bethesda).

Cortison = 17 α ,21-dihydroxy- Δ^4 pregnen-3,11,20-trion (Schering, Berlin).

11-Desoxycortisol (Reichsteins Substanz S) = 17 α ,21-dihydroxy- Δ^4 pregnen-3,20-dion (Schering, Berlin).

Tetrahydrocortisol (THF = 3 α ,11 β ,17 α ,21-tetrahydroxypregnan-20-dion (Steroid Reference Collection, London).

Tetrahydrocortison (THE) = 3 α ,17 β ,21-trihydroxy-pregnan-11,20-dion (Steroid Reference Collection, London).

Tetrahydrocorticosteron (THB) = 3 α ,11 β ,21-trihydroxy-pregnan-20-on (Steroid Reference Collection, London).

Silicagel, grade 923, mesh size 100–200 (W. R. Grace Davison Chemical Division, USA).

Tetrazoliumblau = Blue Tetrazolium (Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, USA).

PPO = 2,5-Diphenyloxazol; POPOP = 1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl) benzol (Packard Instrument Company, Illinois, USA).

β -Glucuronidase, 375 Fishman-Einheiten/mg (Schering, Berlin).

Alle übrigen Reagenzien waren „pro analysi“ und/oder „zur Chromatographie“ von der Firma Merck AG, Darmstadt.

Der Reinheitsgrad der beiden radioaktiven Corticosteroide wurde papierchromatographisch in den beiden von BUSH (9) angegebenen Systemen B/50 und LT 21/85 geprüft; er betrug über 95%.

Verabreichung der radioaktiven Steroide

2,0 μC ^3H -Cortisol und 0,2 μC ^{14}C -Corticosteron, gelöst in absol. Äthanol (0,5 ml), werden mit 20 ml physiol. NaCl-Lösung verdünnt und in 5 Min. i. v. injiziert.

Messung der ^{14}C -Aktivität im Urin

Die Aktivität des in 2 Portionen gesammelten Urins (von 0–24 Std. p. i. und von 24–48 Std. p. i.) wird nach der von FLOOD und Mitarbeitern (2) angegebenen Methode gemessen. Dabei wird $\frac{1}{50}$ der Urinmenge mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt und 0,6 ml des verdünnten Urins mit 6,0 ml Äthanol und 10 ml Szintillatorflüssigkeit (4,0 g PPO¹⁾ + 0,1 g POPOP in 1000 ml Toluol) versetzt. Die ^{14}C -Impulse der Proben werden mit dem

Flüssigkeitsszintillationsspektrometer Packard Tri-Carb. Modell 3002 bei folgender Einstellung 2mal 100 Min. gezählt: Diskriminator A = 50, Diskriminator B = 500, gain = 3. Das „quenching“ der Proben wird mit einem internen Standard bestimmt, dann die ^{14}C -Aktivität der gesamten Urinmenge berechnet und in Prozent der injizierten Aktivität von ^{14}C -Corticosteron umgerechnet.

Separierung des Cortisolmetaboliten Tetrahydrocortisol und des Corticosteronmetaboliten Tetrahydrocorticosteron

Ausgangsmaterial: Tetrahydrocortisol (THF) und Tetrahydrocorticosteron (THB) werden aus $\frac{1}{10}$ der Urinmenge 0–24 Std. p. i. separiert; sind im Urin 24–48 Std. p. i. mehr als 5% der injizierten Aktivität von ^{14}C -Corticosteron vorhanden, wird $\frac{1}{10}$ Vol. der Urinmenge 0–48 Std. p. i. verwendet.

Hydrolyse: Der Urin wird mit $\frac{1}{10}$ Vol. Natriumacetat (0,2M) und $\frac{1}{10}$ Vol. Essigsäure (0,2M) versetzt und mit 300 FE β -Glucuronidase pro ml Urin bei pH 4,6 und 45° 24 Std. hydrolysiert.

Extraktion und Reinigung: Der hydrolysierte Urin wird 3mal mit Methylenchlorid (V/V) extrahiert und die vereinigten Extrakte 2mal mit $\frac{1}{10}$ Vol. 0,1N NaOH sowie 2mal mit $\frac{1}{10}$ Vol. Wasser gewaschen und anschließend mit Natriumsulfat getrocknet. Natronlauge und Waschwasser werden mit Methylenchlorid (V/V) rückextrahiert und die vereinigten Extrakte unter reduziertem Druck abgedampft. Anschließend wird dieser vorgereinigte Extrakt nach PETERSON (10) zwischen Petroläther und wäßr. Äthanol (Petroläther (Kp 60–80°)/Äthanol/Wasser = 100:10:30 V/V) verteilt und die Steroide aus der wäßr. Phase mit Methylenchlorid (3mal 2 Vol.) rückextrahiert. Die Extrakte werden vereinigt und bei 40° unter vermindertem Druck abgedampft.

Papierchromatographie: Im ersten Chromatogramm, System BUSH C (Toluol/Äthylacetat/Methanol/Wasser = 9:1:5:5 V/V), werden die weniger polaren Corticosteronmetaboliten von den höher polaren Cortisolmetaboliten getrennt. Der Extrakt wird auf Whatmanpapier Nr. 1 (Breite der Streifen 8 cm, Länge 33 cm) absteigend nach einer Äquilibrierdauer von 60 Min. bei 23° chromatographiert; Laufzeit etwa 3 Std. Auf Parallelstreifen laufen als Leitsubstanzen Cortison und Reichsteins Substanz S, die mit Tetrazoliumblau-Reagenz (1 Vol. 1proz. wäßr. Lösung von Tetrazoliumblau + 9 Vol. 2N NaOH) sichtbar gemacht werden. Das Chromatogramm wird dann in 2 Zonen geteilt.

Zone I: 2 cm unterhalb des Starts bis zum Beginn der Cortisonzone auf dem Parallelstreifen ($R_F = 0,40$).

Zone II: Vom Ende der Zone I bis zum Ende der Zone von Reichsteins Substanz S auf dem Parallelstreifen ($R_F = 0,9$).

Beide Zonen werden 3mal mit 50 ml Methanol eluiert, die Eluate jeweils halbiert und zur Trockene eingengt.

Die beiden Extrakt hälften der Zone I, die unter anderem THF enthalten, werden auf 2 parallelen Chromatographiestreifen (Whatman Nr. 1, Breite 3 cm, Länge 40 cm) am Start aufgetragen und im System BUSH B/50 (Benzol/Methanol/Wasser = 10:5:5 V/V) absteigend rechromatographiert (Äquilibrierdauer 60 Min., Laufzeit 24 Std. bei 23°); auf Parallelstreifen laufen die Reinsubstanzen THF und THE. Die beiden Hälften der Eluate von Zone II, die unter anderem THB enthalten, werden unter analogen Bedingungen 28 Std. im System BUSH LT 21/85 (Petroläther (Kp 60–80°)/Toluol/Methanol/Wasser = 66,6:33,3:85:15 V/V) rechromatographiert. Auf einem Parallelstreifen läuft als Leitsubstanz THB.

Von jedem Chromatogramm wird jeweils ein Streifen mit der Hälfte des Extrakts mit Tetrazoliumblau-Reagenz angefärbt und die THF und THB entsprechende Zone der Parallelstreifen (mit der zweiten Hälfte des Extrakts) 3mal mit 5 ml Methanol eluiert und die beiden Eluate bei 40° unter vermindertem Druck abgedampft.

Säulenchromatographie: 2 Säulen mit je 2 g Silicagel (Säulendurchmesser 10 mm) werden mit 15 ml Methanol/Chloroform (V/V) vorgewaschen, die beiden Eluate von den Papierchromatogrammen mit THF und THB quantitativ übertragen und die Steroide

¹⁾ **Abkürzungen:** PPO = 2,5-Diphenyloxazol; POPOP = 1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl)benzol, FE = Fishman-Einheiten, THF = Tetrahydrocortisol, THE = Tetrahydrocortison, THB = Tetrahydrocorticosteron, 17-OHCS = 17-Hydroxycorticosteroide.

mit 20 ml Methanol/Chloroform (V/V) eluiert. Nach Abdampfen der Eluate wird der Trockenrückstand mit THF und THB in 3 ml absol. Äthanol gelöst. 2 ml dienen zur quantitativen Bestimmung und 1 ml zur Messung der Radioaktivität.

Kolorimetrische Bestimmungen von THF und THB: Die beiden Metaboliten THF und THB werden nach SEEGER (11) quantitativ bestimmt: 2 ml des in 3 ml absol. Äthanol gelösten Eluates aus der Silicagelsäule mit THF oder THB werden mit 0,2 ml Tetrazoliumblau-Reagenz (15 mg Tetrazoliumblau gelöst in 3 ml absol. Äthanol) und 0,2 ml einer alkohol. Tetramethylammoniumhydroxyldlösung (0,5 ml 10proz. Tetramethylammoniumhydroxyd + 4,5 ml absol. Äthanol) versetzt. Nach 25 Min. im Thermostat bei 25° werden 0,05 ml Eisessig zugegeben und die Extinktion der Probe mit dem Spektralphotometer (Beckman DU) bei 510 nm (Schichtdicke 10 mm) gegen den Leerwert der Reagenzien gemessen. Nach Abzug des Papierleerwertes (< 5% der Extinktion des Hormonwertes) wird die Steroidmenge der Proben an einer Eichkurve, die mit den beiden Reinsubstanzen THF und THB aufgestellt wird, abgelesen und in mg pro Urinagesmenge umgerechnet. Bei jedem Ansatz werden zur Kontrolle der Eichwerte 10 µg THF und THB mitbestimmt.

Messung der Aktivität von ³H-THF und ¹⁴C-THB: Der Rest der Eluate aus den beiden Silicagelsäulen (je 1 ml) wird quantitativ in Meßgläschen übertragen und das Lösungsmittel abgedampft. Nach Zugabe von 1 ml absol. Äthanol und 10 ml Szintillatorflüssigkeit wird die ¹⁴C- oder ³H-Aktivität der Proben mit dem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer nach der Ausblendmethode von OKITA und Mitarbeitern (15) gemessen (Kanal I — Diskriminator A = 50, Diskriminator B = 500; gain = 2; Kanal II — Diskriminator C = 50, Diskriminator D = 1000; gain = 100).

Berechnung der Sekretionsrate: Die Sekretionsraten wurden nach der vereinfachten Formel von PEARLMAN (12) und PETERSON und PIERCE (13) berechnet (7).

$$\text{Sekretionsrate von Cortisol} = \frac{J_i \cdot X}{J_x \cdot t} \quad (\text{mg/Tag})$$

J_i = Aktivität (Imp./Min.) des injizierten ³H-Cortisol gezählt in Kanal II

J_x = Aktivität (Imp./Min.) von ³H-THF gezählt in Kanal II umgerechnet auf die gesamte Urinmenge. Dabei gilt:

$J_x = (\text{Imp./Min. in Kanal II} - c \cdot \text{Imp./Min. in Kanal I}) \cdot 60$
 c = Verhältnis der ¹⁴C-Impulse in Kanal II/Kanal I

X = mg THF umgerechnet auf die gesamte Urinmenge

t = Urinsammelperiode in Tagen

$$\text{Sekretionsrate von Corticosteron} = \frac{J_i \cdot X}{J_x \cdot t} \quad (\text{mg/Tag})$$

J_i = Aktivität (Imp./Min.) des injizierten ¹⁴C-Corticosteron gezählt in Kanal I

J_x = Aktivität (Imp./Min.) von ¹⁴C-THB gezählt in Kanal I

X = mg THB umgerechnet auf die gesamte Urinmenge

t = Urinsammelperiode in Tagen

Ergebnisse und Diskussion

Die Applikation des radioaktiven Steroids zur Bestimmung einer Sekretionsrate nach dem Isotopenverdünnungsprinzip erfolgt *intravenös*, da nicht geklärt ist, ob nach oraler Verabreichung die einzelnen Steroide von allen Probanden unverändert und vollkommen resorbiert werden und ob die aus dem Verdauungstrakt aufgenommenen Hormone ebenso metabolisiert werden wie die von der Nebennierenrinde sezernierten Steroide. Wir injizierten die in Äthanol gelösten radioaktiven Steroide verdünnt mit 20 ml physiol. NaCl-Lösung. Der Verlust, der bei der In-

jektion entsteht, ist gering. Im Mittel verblieben nur 0,39% (0,04% bis 0,79%; $n = 8$) der Aktivität in der Kanüle und in der Injektionsspritze.

Transport und Stoffwechsel von endogenem Cortisol und Corticosteron werden durch die zugeführten Isotope nicht beeinflusst, denn die von uns injizierten Hormonmengen (5,6 µg Cortisol und 1,5 µg Corticosteron) liegen unter 1% des Hormonpools dieser beiden Steroide, den PETERSON (14) für Cortisol mit 1,2 bis 2,4 mg und für Corticosteron mit 0,2 bis 0,4 mg angibt.

Die ³H- und ¹⁴C-Aktivität des Urins kann nach gleichzeitiger Injektion von ³H-Cortisol und ¹⁴C-Corticosteron mit der sogenannten Ausblendmethode (15) bestimmt werden. Wir fanden dabei den Standardmeßfehler für die Zählung der ¹⁴C-Aktivität des Urins mit einem Variabilitätskoeffizienten von 1,2% relativ gering. Dagegen ist die Bestimmung der Tritiumaktivität des Harns mit dieser Zählmethode bei den geringen Impulsraten und bei dem „quenching“ der Proben mit einem größeren Meßfehler behaftet. Nachdem der Ausscheidungsmodus für Cortisol und Corticosteron annähernd gleich ist (10) haben wir, um uns über die Ausscheidung der Radioaktivität im Urin zu orientieren, nur die ¹⁴C-Aktivität bestimmt. Im Mittel fanden wir in den ersten 24 Stdn. p. i. 83,3% der injizierten ¹⁴C-Aktivität im Urin ($n = 13$). Dieser Wert ist in der gleichen Größenordnung wie nach Injektion von ¹⁴C-Corticosteron allein (6, 7).

Im Extrakt nach Hydrolyse mit β-Glucuronidase betrug bei der Messung mit der Ausblendmethode (15) die ³H-Aktivität im Mittel 29,6% und die ¹⁴C-Aktivität im Mittel 30,7% ($n = 13$), bezogen auf die jeweils injizierte Aktivität.

Der Verlust bei den einzelnen Arbeitsgängen zur Separierung der Metaboliten von Cortisol und Corticosteron, THF und THB, geht aus Tabelle 1 hervor.

Tab. 1
Verlust bei den einzelnen Arbeitsgängen

Arbeitsgang	Verlust von	
	¹⁴ C-Aktivität %	³ H-Aktivität %
Extraktion	5,0—7,8	4,5—8,8
Petrolätherverteilung	2,9—4,3	4,2—6,0
Papierchromatographie		
1. Chromatogramm	1,5—5,5	2,0—6,0
2. Chromatogramm	0,5—2,7	3,0—7,2
Säulenchromatographie	>0,5	>0,5

Der Gesamtverlust beträgt 20% bis 25% ($n = 8$). Das Endergebnis wird dadurch zwar nicht beeinflusst, da die Sekretionsrate der Steroide aus der spezifischen Aktivität der Steroidmetaboliten und nicht nur aus der Absolutmenge berechnet wird. Der Verlust sollte trotzdem möglichst gering sein, um bei der relativ kleinen Urin-Ausgangsmenge in den optimalen Bereich der Nachweisreaktion zu kommen.

Die Reinheit von THF und THB wurde durch einen Vergleich der Spektralkurven mit den von reinem THF und THB in konzentrierter Schwefelsäure nach der Methode von AXELROD (16) geprüft. Die separierten

Tab. 2
Gleichzeitig bestimmte Sekretionsraten von Cortisol und Corticosteron bei 12 Normalpersonen

Name	Alter und Geschlecht	17-OHCS im Urin mg/24 Stdn.	¹⁴ C-Aktivität im Urin 0–24 Stdn. p. l. % der inj. ¹⁴ C-Aktivität	THF im Urin mg/24 Stdn.	Aktivität von ³ H-THF % der inj. ³ H-Aktivität	Sekretionsrate von Cortisol mg/24 Stdn.	THB im Urin mg/24 Stdn.	Aktivität von ¹⁴ C-THB % der inj. ¹⁴ C-Aktivität	Sekretionsrate von Corticosteron mg/24 Stdn.	Quotient der Sekretionsraten Cortisol/Corticosteron
R. G.	24 ♀	4,7	80,1	0,59	4,0	14,7	—	—	—	—
+			75,5	—	—	—	0,17	6,0	2,8	—
+		3,8	72,7	0,60	3,0	20,0	0,20	5,2	3,8	5,3
B. J.	17 ♀	3,5	88,0	0,20	1,6	12,5	0,17	6,4	2,7	4,6
V. H.	48 ♀	3,2	71,4	0,65	3,8	17,1	0,15	4,3	3,5	4,9
T. P.	41 ♀	3,4	68,2	0,45	4,3	10,5	0,19	8,4	2,3	4,6
M. M.	43 ♀	2,8	90,3	0,29	2,0	14,5	0,14	5,8	2,4	6,0
S. E.	33 ♀	4,4	81,3	0,62	3,5	17,7	0,30	7,9	3,8	4,7
S. W.	48 ♀	4,0	90,0	0,38	2,3	16,5	0,18	4,8	3,7	4,5
S. K.	21 ♀	2,5	81,0	0,44	3,2	13,7	0,19	4,7	4,0	3,4
G. G.	25 ♀	4,6	89,6	0,26	1,6	16,2	0,10	3,0	3,3	4,9
H. J.	40 ♀	5,0	83,6	0,25	2,0	12,5	0,12	4,3	2,8	4,5
B. F.	46 ♀	2,1	96,6	0,26	2,0	13,0	0,15	3,6	4,2	3,1
U. B.	18 ♀	2,1	75,5	0,30	2,2	13,6	0,18	4,5	4,0	3,4

Steroide hatten die gleichen Extinktionsmaxima wie die reinen Hormone (THF bei 510 nm, 420 nm und 330 nm; THB bei 440 bis 430 nm und 320 nm).

Auf den Chromatogrammen waren im System LT 21/85 in der Zone von THB + ¹⁴C-THB unter 0,1% der injizierten Tritium-Aktivität nachweisbar und im System B/50 in der Zone von THF + ³H-THF weniger als 0,2% der applizierten ¹⁴C-Aktivität. Trotz dieser nur geringen Überlagerung der ¹⁴C- und ³H-Aktivitäten wurden die Impulse mit der Ausblendmethode gezählt. Ein „quenching“ der Proben war nicht nachweisbar.

Genauigkeit und Empfindlichkeit der gesamten Methode hängen von der Genauigkeit und Empfindlichkeit der Tetrazoliumblau-Reaktion und der Genauigkeit der Zählung der ¹⁴C- und ³H-Impulse der Steroidmetaboliten ab. — Die Fehlerbreite bei der quantitativen Bestimmung von Steroiden mit der Tetrazoliumblau-Reaktion ist mit ungereinigten Eluaten von Papierchromatogrammen groß, da die Papierleerwerte hohe und vor allem unterschiedliche Extinktionen ergeben. Erst nach Reinigung der Eluate auf einer Silicagelsäule betrug die Extinktion der Papierleerwerte nur noch maximal 0,01. Bei der quantitativen Bestimmung von 10 µg reinem THF oder THB betrug die Standard-

abweichung $s = 0,1$, die Wiederfindung nach einmaliger Papier- und Säulenchromatographie im Mittel 94,5% (92% bis 101%) ($n = 10$). Die untere Nachweisgrenze mit der Tetrazoliumblau-Reaktion liegt bei 0,5 µg; bis 40 µg folgt die Reaktion dem LAMBERT-BEERSchen Gesetz. — Bei der Zählung der Impulse von ¹⁴C-THB ergab sich ein Variabilitätskoeffizient im Mittel von 1,09% (0,73% bis 1,05%) und bei der Zählung der Impulse von ³H-THF im Mittel von 0,85% (0,73% bis 1,04%) ($n = 20$).

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der gleichzeitig bestimmten Sekretionsraten von Cortisol und Corticosteron von 12 Normalpersonen (10 Frauen und 2 Männer) im Alter von 17 bis 48 Jahren zusammengestellt. Die Cortisolsekretion betrug 10,5 bis 20,0 mg/24 Stdn., die Corticosteronsekretion 2,3 bis 4,2 mg/24 Stdn. Im Mittel sind die Sekretionsraten von Cortisol (14,8 mg/24 Stdn.) und Corticosteron (3,3 mg/24 Stdn.) in der gleichen Größenordnung wie bei Bestimmung jeder Sekretionsrate einzeln bei Normalpersonen (17). Der Quotient der Sekretionsraten Cortisol/Corticosteron betrug im Mittel 4,4. Bei Einzelbestimmungen der Sekretionsraten an verschiedenen Tagen war nach VAN DER STRAETEN und Mitarbeitern (6) dieser Quotient mit 6,7 größer.

Literatur

- COPE, C. L. und E. G. BLACK, Clin. Sc. London 17, 147 (1958).
- FLOOD, C., D. S. LAYNE, S. RAMCHARAN, E. ROSSIPAL, J. F. TAIT und S. A. S. TAIT, Acta endocr. (K'hvn) 36, 237 (1961). — 3. LAUMAS, K. R., J. F. TAIT und S. A. S. TAIT, Acta endocr. (K'hvn) 36, 265 (1961). — 4. TAIT, J. F., J. Clin. Endocr. Springfield 23, 1285 (1963). — 5. KARL, H. J., in: Radio-Isotope in der Endokrinologie S. 365 hrsg. von G. HOFFMANN, F. K. Schattauer, Stuttgart (1965). — 6. VAN DER STRAETEN, M., A. VERMEULEN und N. ORIE, Acta endocr. (K'hvn) 43, 430 (1963). — 7. KARL, H. J. und L. RAITH, Klin. Wschr. 43, 863 (1965). — 8. SIEGENTHALER, W. E., A. J. DOWDY und J. A. LUETSCHER, J. Clin. Endocr. Springfield 22, 172 (1962). — 9. BUSH, I. E., The chromatography of steroids. New York-Oxford-London-Paris: Pergamon Press (1961). — 10. PETERSON, R. E., J. B. WYNGAARDEN, S. L. GUERRA, B. B. BRODIE und J. J. BUNIM, J. clin. Invest. 34, 1779 (1955). — 11. SEEGER, E., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exper. Path. 242, 101 (1961). — 12. PEARLMAN, W. H., Ciba Found. Coll. on Endocr. 11, 233 (1957). — 13. PETERSON, R. E. und C. E. PIERCE, J. clin. Invest. 39, 741 (1960). — 14. PETERSON, R. E., Recent Progr. Hormone Res. N. Y. 15, 231 (1959). — 15. OKITA, G. T., J. J. KABARA, F. RICHARDSON und G. V. LEROY, Nucleonics 15, 111 (1957). — 16. AXELROD, L. R., J. biol. Chemistry 205, 173 (1953). — 17. KARL, H. J. und L. RAITH, Klin. Wschr. 43, 867 (1965).

Dr. L. Raith u. Priv.-Doz. Dr. H. J. Karl
8000 München 15
Ziemssenstr. 1